

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

無細胞タンパク質アレイを用いたプロテインキナーゼおよびユビキチンリガーゼの基質タンパク質探索技術

澤崎達也, 竹田浩之, 高橋宏隆, 根本圭一郎

タンパク質修飾は、生命現象の重要な制御機構である。タンパク質修飾のリン酸化は既に多くの研究によりシグナル伝達の主要スイッチと考えられているが、ユビキチン化もタンパク質分解シグナル以外の機能が見いだされ、新たな細胞内シグナル伝達の制御機構であることがわかってきた。特に近年の質量分析機器の目覚ましい発展と共にプロテオミクス解析は、網羅的なユビキチン化やリン酸化されたタンパク質の情報を研究者に提供し始めた。しかし、そのような細胞内のリン酸化やユビキチン化の情報がわかっていても、それらの修飾を触媒するプロテインキナーゼやE3ユビキチンリガーゼを同定することは、まだまだ難しいのが現状である。本稿では、我々が開発してきたコムギ無細胞タンパク質合成系を基盤とした、タンパク質アレイを用いた目的タンパク質のリン酸化やユビキチン化を触媒する酵素タンパク質を同定する技術について紹介する。

1. はじめに

シグナル伝達におけるタンパク質修飾の主要機構であると考えられているリン酸化はプロテインキナーゼにより触媒される。ヒトゲノム上には約500種類、モデル高等植物であるシロイヌナズナのゲノム上では約1,300種類のプロテインキナーゼが見いだされている。また、最近注目されているタンパク質修飾の一つであるユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素 (E1)→ユビキチン結合酵素 (E2)→ユビキチンリガーゼ (E3) の順序で進行する。ユビキチンリガーゼのタンパク質機能はユビキチン化する基質タンパク質とE2を適度な距離に保つ“足場”を提供することにあると考えられており、それゆえタンパク質のユビキチン化の特異性は、ユビキチンリガーゼに委ねられているとい

える。ヒトゲノム上には600~800種類のユビキチンリガーゼが見いだされている。これらのプロテインキナーゼとユビキチンリガーゼの共通の特徴は、基質タンパク質と一時的にでも相互作用することにある。相互作用するタンパク質の全てが触媒基質ではないが、少なくとも相互作用するタンパク質は有力な基質候補であるといえる。しかし、この相互作用は弱い場合が多く、広く用いられる細胞内へ過剰発現させたのちの免疫沈降では、うまく検出できない場合が多い。また、細胞内はリン酸化タンパク質を脱リン酸化するホスファターゼ酵素や強力なタンパク質分解装置であるプロテアソームが存在するため、細胞実験系ではリン酸化やユビキチン化された目的タンパク質が検出できないことが多い。市販のプロテアソーム阻害剤の毒性が高いため長時間処理するとアポトーシスを誘導することなども解析を困難にしている。そのため、細胞生物学的な手法ではなく生化学的な手法により、目的タンパク質をリン酸化やユビキチン化する触媒酵素タンパク質を容易に同定できる技術がシグナル伝達研究のために求められている。

原理的には、対象となるゲノム上の遺伝子を鋳型に全てのプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼを組換えタンパク質として取りそろえ、目的タンパク質と相互作用する

愛媛大学プロテオサイエンスセンター (〒790-8577 愛媛県松山市文京町3番)

Cell-free based protein array technology for analyses of protein kinases and ubiquitin ligases

Tatsuya Sawasaki, Hiroyuki Takeda, Hirotaka Takahashi and Keiichirou Nemoto (Proteo-Science Center, Ehime University, 3 Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8577, Japan)

酵素の探索や、目的タンパク質に対してリン酸化やユビキチン化を触媒する酵素タンパク質を *in vitro* 系で同定することが可能である。このアプローチは非常に理にかなっているが、そのためには、①数百種類規模の機能を保持した組換えタンパク質の調製および②目的タンパク質の相互作用の高感度検出の二つの技術を必要とする。一般的に組換えタンパク質を得るためには生きた大腸菌を用いるが、大腸菌の生産系を利用して機能を保持した数百種類のタンパク質を取りそろえることは、経験者なら気の遠くなる実験であると容易に想像できる。タンパク質を用いた生化学実験の成否のほぼ全ては機能を保持した組換えタンパク質を入手できるかどうかにかかっているといっても過言ではない。

大腸菌やコムギ胚芽を用いた無細胞タンパク質合成技術は、日本が中心となって開発してきた歴史をもち、生細胞を用いない組換えタンパク質合成技術として期待されている。無細胞タンパク質合成技術の詳細は、2007年の生化学誌特集号（“特集：無細胞生命科学の創成”，第79巻第3号）を見ていただきたい。本稿では、無細胞タンパク質合成技術を基盤に我々が進めてきたタンパク質アレイ、特にプロテインキナーゼとユビキチンリガーゼのタンパク質アレイの構築法、およびタンパク質アレイを用いた高感度相互作用の検出方法を中心に、目的タンパク質をリン酸化するプロテインキナーゼやユビキチン化するユビキチンリガーゼの同定に向けて、無細胞系を用いた生化学実験の原理と実施例を示す。それを通じて、上記①と②に対する我々のアプローチを紹介したい。

2. タンパク質アレイの構築

我々は、各ウェルに種々の組換えタンパク質を保持した96穴もしくは384穴マイクロタイタープレートをタンパク質アレイと呼んでいる。コムギ無細胞系を用いれば96穴プレートの各ウェルにそれぞれ異なる組換えタンパク質を合成し容易にタンパク質アレイを構築できる。コムギ無細胞タンパク質合成は自動化が進んでおり、鋳型DNAをセットするだけで一度に384種類のタンパク質を合成する装置の開発は既に終了している¹⁾。タンパク質アレイを用いることで、後ほど示すような様々なタンパク質解析が384穴プレート上で効率的に実施可能になる。

一般的に完全長cDNAライブラリーは384穴プレート上にプラスミドを保持した大腸菌のグリセロール溶液として保存されている。我々が所属するプロテオサイエンスセンターでは、各15,000種類ほどのヒト、マウス、シロイヌナズナ、および2,000種類ほどのマラリア原虫の完全長cDNAライブラリーを保有している。また、これらを統合した独自のデータベースを構築しており、ラボ内のパソコンで必要な遺伝子を入力すると、どのプレートのどのウェ

ルに保存されているか検索できる環境を整備している。我々はヒトがもつ約500種類のプロテインキナーゼの中から約400種類²⁾、シロイヌナズナでは約700種類をタンパク質アレイとして用意している³⁾。一方、ヒトゲノムには1,000種類以上のユビキチンリガーゼ遺伝子が見いだされている。ユビキチンリガーゼとして機能するタンパク質は大別すると、Cullinを足場にしたSCF (Skp, Cullin, F-box containing complex) などと呼ばれる複合体を形成するタイプと、単独でユビキチン化を誘導するタイプの二つに分けられる。我々は最初のトライアルとして、単独で活性を有している場合が多いRING型ユビキチンリガーゼを対象とした。その理由として、ヒトゲノム上には350種類ほどのRING型ユビキチンリガーゼが知られており⁴⁾、p53タンパク質を分解するMDM2などの生物学的に重要なタンパク質が含まれることや、まだ多くのRING型ユビキチンリガーゼは機能未知であり生物学的に重要な新しいユビキチン化タンパク質の発見が期待できたためである。

我々が構築した完全長cDNAライブラリーデータベースから対象の遺伝子をヒトのものを中心に一部マウスの遺伝子で補完しつつ選別し、96穴プレートの各ウェルにアレイを行い、完全長cDNAアレイを96穴プレート上に構築した。ヒトの完全長cDNAはベクターのバックボーンもまちまちであり、PCRを用いた鋳型構築にはあまり適していない。そこで、Gatewayシステムを用いて、pDONR221ベクターに全ての遺伝子のORF (open reading frame) をそれぞれ組み込み、それらを保持した大腸菌を保存したプレートを鋳型DNA作りのために用いた。コムギ無細胞タンパク質合成に適した鋳型には、SP6 RNAポリメラーゼ用のプロモーター (SP6)、翻訳エンハンサー (E01もしくはE02)、さらに相互作用解析に用いるN末端ビオチン化に必要な配列 (bls) の全てを、タンパク質アレイ用の個々の遺伝子 (ORF) に付加した鋳型 (SP6-E02-blis-ORFの形) で構築する必要がある。この鋳型DNA構築の詳細は文献⁵⁾を見ていただくとして、2段階のPCRにより、タンパク質合成用の鋳型DNAを構築した。シロイヌナズナの完全長cDNAはベクターバックボーンがほぼ均一であるため、Gateway化しなくても目的のプラスミドをもつ大腸菌をPCR反応液に加えるだけで鋳型構築が可能である³⁾。このPCR産物を冷凍で保存しておけば、自動タンパク質合成装置を用いていつでもフレッシュなタンパク質が合成可能である。

3. タンパク質アレイとAlphaScreen技術を組み合わせたタンパク質-タンパク質間相互作用検出法の原理

目的タンパク質のリン酸化やユビキチン化を触媒するタンパク質を見つけ出すためには、目的タンパク質と相互作用するプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼを探索す

るアプローチは有効である。酵母に代表されるツーハイブリッド法は、転写因子を利用した非常に優れた方法であるが、ユビキチンリガーゼのような細胞内で分解誘導する因子や、弱い相互作用因子の同定が難しいなど、解決が原理的に難しい問題点をいくつか有している。また、上述のように、生細胞を用いて全ての組換えタンパク質をある程度の量で発現させることは、実際行ってみると難しく、ライブラリー内に遺伝子が含まれているからといって機能を有したタンパク質が生細胞内で合成されているかどうかは、スクリーニングの段階での確認はできない。

このような実験的限界の打破を目指して、多くの研究室で、生化学実験的に相互作用するタンパク質を同定する方法の開発が進められている。タンパク質-タンパク質の相互作用を生化学的にかつ網羅的に検出する技術は Biacore やプロテインチップなどが知られている。しかし、Biacore の場合はスループット性が低く、またプロテインチップはスループット性は十分だが、タンパク質がチップ上で乾燥するという弱点があり、実際にタンパク質が機能を失う場合が多いことや、ダイナミックレンジが小さいた

め結合能が高い相互作用因子しか検出できないなどの欠点がある。そこで、我々はこれまでに培ってきたコムギ無細胞タンパク質合成技術を基盤に、タンパク質がプレートの各ウェルに並んだタンパク質アレイの構築と、パーキンエルマー社が提供している AlphaScreen 技術をもとにタンパク質-タンパク質の相互作用を高感度かつハイスループットに検出できる技術の開発を行った。これにより、上述の Biacore やプロテインチップがもつ問題点を解決し、非常に簡便に相互作用タンパク質を同定することが可能になった。

目的タンパク質と相互作用するプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼを探索する原理は、ビオチン化したプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼタンパク質と、特異的抗体により認識される Flag タグを付加した Flag ラベル目的タンパク質を混合することが最初の反応となる。目的タンパク質がプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼタンパク質と相互作用する場合、図 1 (中央上) のような複合体を形成する。原理のポイントは溶液中のこの複合体を、どのような手法で検出するかにある。上記 2 種類のタ

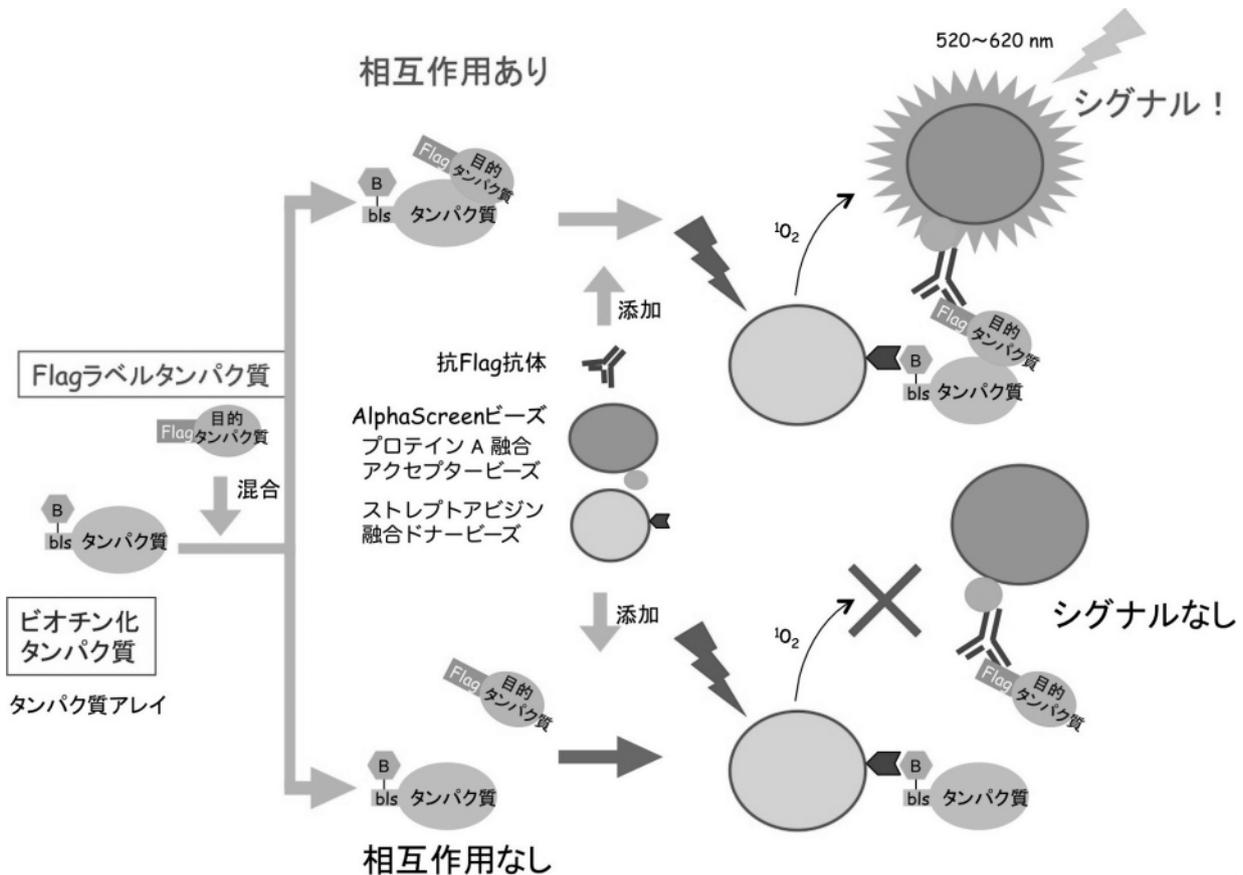


図 1 タンパク質アレイと AlphaScreen 技術によるタンパク質-タンパク質間相互作用検出原理

ビオチン化タンパク質と Flag ラベルタンパク質の相互作用が起きれば、2種類の AlphaScreen 用ビーズを含む右上のような複合体が形成され、相互作用を発光値として検出できる。もし相互作用が起これなければ、右下のような形となり、発光は検出できない。ビオチン-ストレプトアビジン、Flag タグ-抗 Flag 抗体の特異性と親和性が高いため、未精製の合成反応液を用いても検出可能である。

ンパク質混合後に2種類のビーズ、ストレプトアビジンを融合したドナービーズとプロテインAを結合したアクセプタービーズを添加する。ビオチンは高親和かつ特異的にドナービーズ上のストレプトアビジンと結合し、またアクセプタービーズは特異的抗体を介してFlagラベル目的タンパク質と結合し、より大きな複合体を形成する。ここに、680 nmのダイオードレーザーを照射すると、ドナービーズは周りの酸素分子を一重項酸素 (1O_2) に変換し、この一重項酸素がアクセプタービーズまで届いた場合、アクセプタービーズから520~620 nmの化学発光が得られる。つまり、ビオチン化タンパク質とFlagラベル目的タンパク質の相互作用を、発光測定値として検出することができる(図1)。これがAlphaScreen技術である。この検出系は、下記のような利点を有している。溶液中の反応であるため、乾燥などのタンパク質の変性が起こらず、単なる溶液同士の混合反応なため自動化が可能である。また、いわゆるFRETなどのエネルギートランスファーの相互作用検出実験とは異なり励起光より低い波長の発光を検出するため、バックグラウンドが非常に低く、さらにダイナミックレンジが4桁以上あり弱い相互作用から強い相互作用まで同じ系で検出可能である。さらに前述の2種類のビーズがラベル化されたタンパク質を特異的に認識できることから、未精製のままのタンパク質の利用ができ非常に簡単にアッセイを行うことが可能である。実際の測定値でみると、プロテインキナーゼと相互作用する転写因子(図3A参照)や、p53に結合することが知られているユビキチンリガーゼMDM2の相互作用が顕著に検出できていることがわかる(図4A参照)。我々の研究室では自動分注機を導入することで1日に1万アッセイ以上の相互作用解析が可能となっている。

4. ユビキチン化タンパク質検出の原理

相互作用するユビキチンリガーゼを見つけた後の解析にもAlphaScreen技術は有効である。目的タンパク質との相互作用能以外に、ユビキチンリガーゼはE1やE2の酵素とともに機能して目的タンパク質にユビキチンを付加する活性を有している。最も直接的なユビキチンリガーゼの同定方法は、このユビキチン化能を指標としたスクリーニング技術である。しかし、ユビキチン化を指標としたユビキチンリガーゼ探索技術は、世界で誰も成功していない。ユビキチンリガーゼとE2タンパク質間にはある程度の特異性があり、どのユビキチンリガーゼにも対応可能な万能E2タンパク質は存在しない。E2タンパク質は、ヒトゲノム上に30種類程度存在し、ユビキチンリガーゼとE2タンパク質の至適な組み合わせははまだ研究途上である。例えばユビキチンの63番目のリジンにユビキチンを付加するE2タンパク質はヘテロ複合体であることが知られてお

り、他にもヘテロ複合体でのみ機能するE2が存在する可能性も指摘されているなど、解析したいユビキチンリガーゼと相性の良いE2タンパク質を同定することも現時点では難しいのが現状である。一般的には、UBE2D1やUBE2D2がE2タンパク質の代表として使われている。我々もそれらを最初の選択肢としてユビキチン化に利用している。

タンパク質アレイを用いたユビキチン化検出には、上記の相互作用検出と同様のAlphaScreen技術を用いている。原理に関して上述の相互作用の実験と異なるのは、1) ユビキチン化を検出したい目的タンパク質をビオチン化している、2) Flagラベルユビキチンを使っている、3) E1およびE2タンパク質を混合している、の3点である。要は*in vitro*ユビキチン化によるユビキチンと目的タンパク質の結合をAlphaScreen技術により高感度・簡便に検出するものである。上述の相互作用検出と同様の2種類のAlphaScreenビーズを用いる。ビオチン化された目的タンパク質は、ストレプトアビジンが融合したドナービーズと結合し、Flagラベルユビキチンは特異的抗体を介してプロテインAを融合したアクセプタービーズと結合する。そのため、*in vitro*でユビキチン化された目的タンパク質が存在する場合、2種類のビーズを近接させた複合体が形成される。ここに上述と同様にレーザー照射すると化学発光が得られる。その結果ユビキチン化を発光測定値として検出することができる(図2)。さらに、この検出系を応用することにより、ユビキチンリガーゼ依存的なポリユビキチン鎖形成の検出および数値化が可能である⁶⁾。この方法では、目的タンパク質やユビキチンリガーゼタンパク質などにはビオチン化やFlagタグなどを付加せず、ビオチン化ユビキチンとFlagラベルユビキチンを用いて*in vitro*ユビキチン反応をさせる。その結果、ポリユビキチン鎖の中に、ビオチン化ユビキチンとFlagラベルユビキチンが混在したポリユビキチン鎖が形成される。そこにAlphaScreen用の2種類のビーズを添加すると、ポリユビキチン鎖上で、2種類のビーズが近接し、ポリユビキチン鎖の検出が可能となる。

5. プロテインキナーゼおよびユビキチンリガーゼの基質タンパク質探索の実際

ここからは上述の方法論を用いたスクリーニングの実施例を紹介する。

1) プロテインキナーゼ探索の実施例

我々は上述のように、ヒトを中心とした約400種類からなるアレイ²⁾と約700種類からなるシロイヌナズナのアレイ³⁾の2種類のプロテインキナーゼタンパク質アレイを保有している。それらを用いて、ウイルスタンパク質と相互作用するキナーゼ⁷⁾や、カスパーゼで切断されるキナーゼ

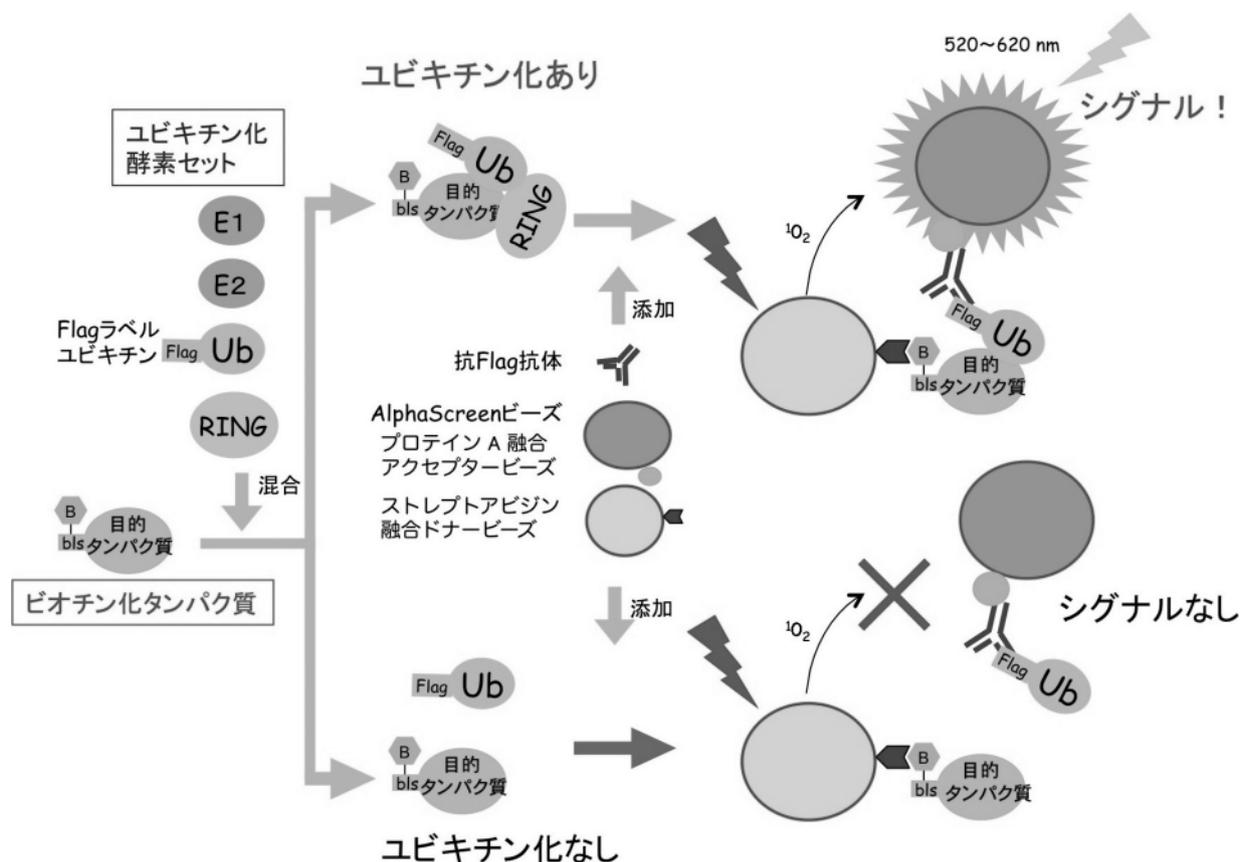


図2 タンパク質アレイと AlphaScreen 技術によるユビキチン化検出原理

反応液に混合するユビキチンリガーゼ (図では RING) 依存的なユビキチン化を、ビオチン化タンパク質への Flag ラベルユビキチンタンパク質の付加により検出する。ユビキチン化タンパク質と AlphaScreen 用の 2 種類のビーズが右上のような複合体を形成すれば、ユビキチン化を発光値として検出できる。もし、ユビキチン化が起これなければ、右下のような形となり、発光は検出できない。ただし原理的に、目的タンパク質がユビキチン結合能を有していた場合でも、右上と同様となり、発光値が得られてしまう。そのため、ユビキチンリガーゼの代わりに、別のタンパク質を混合したコントロール実験は必須であり、加えたユビキチンリガーゼ依存的な反応かどうかの確認を行う。

の同定を行ってきた²⁾。それ以外にも、1 回膜貫通領域をもつヒトタンパク質アレイ⁸⁾や、シロイヌナズナのプロテインホスファターゼ⁹⁾や転写因子タンパク質アレイなどを保有し、必要に応じて使い分けている。今回は、デュアルプロテインキナーゼであるシロイヌナズナのカゼインキナーゼ (AtCKL4) を例に、AtCKL4 がチロシン残基をリン酸化する基質を 200 種類のシロイヌナズナ転写因子から探索した実験を紹介する。方法は、上述のタンパク質-タンパク質相互作用検出法を用いている。

最初のステップは、コムギ無細胞タンパク質技術で合成した 200 種類の転写因子の合成反応液 (未精製) を 5 倍希釈し、384 穴のプレートの各ウェルに 5 μ L ずつ分注する。再現性を確認するため、同じプレートを 2 枚作る。各ウェルに 5 倍希釈した AtCKL4 合成反応液 (未精製) を 5 μ L ずつ分注し、1 時間インキュベートする。この時間が酵素-基質間の相互作用反応の時間である。その後、Flag タグ検出用の AlphaScreen ビーズを 15 μ L 添加し、さらに 1 時間静置する (AlphaScreen ビーズと複合体形成のための

時間)。このとき、AlphaScreen ビーズは光により劣化しやすいのでアルミホイルで遮光する。反応後、EnVision などの測定器で化学発光を測定する。我々は、この一連の反応を分注機で行う設備を構成しており、1 日に 384 穴プレートで 25 枚、9600 アッセイ分の反応が可能である。

相互作用したタンパク質がある場合、高い発光値 (縦軸) が見いだせる (図 3A)。上位 20 種類を選び、一般的な *in vitro* キナーゼアッセイを行った。ストレプトアビジンが融合したマグネットビーズでビオチン化転写因子を回収し、精製した Flag タグ融合 AtCKL4 を加え、リン酸化反応後、SDS-PAGE で分離し、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロットによりリン酸化を検出した (図 3B, 上図)。ラジオアイソトープラベルされた ATP を用いて、リン酸化を検出しても良い。組換え転写因子タンパク質はビオチン化されているため、合成確認は蛍光物質付加ストレプトアビジンを用いた (図 3B, 下図)。本実験では、上位 20 種類の中に、AtCKL4 によりチロシン残基がリン酸化される基質転写因子が二つ見いだせた (TF02 と

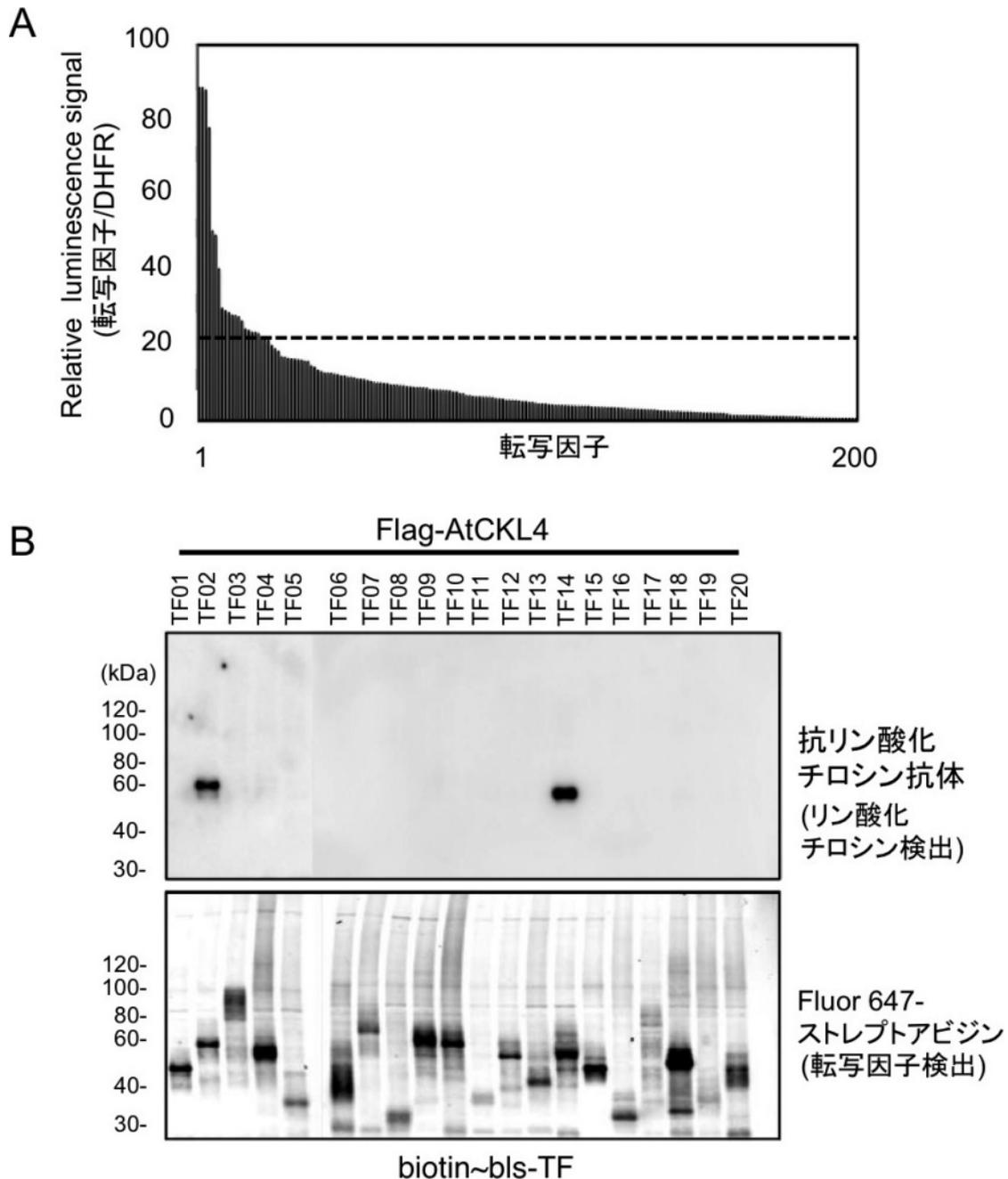


図3 プロテインキナーゼ基質タンパク質の探索例

(A) 200種類のビオチン化されたシロイヌナズナ転写因子タンパク質アレイと Flag ラベルされた AtCKL4 との相互作用を AlphaScreen 法により測定した。縦軸は蛍光値、横軸は個々の転写因子を示している。コントロールとして用いた大腸菌由来の DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) タンパク質の測定値を基準に相対値で評価している。左から順に、蛍光値が高い転写因子、つまり AtCKL4 と相互作用している転写因子を示した。横点線は、上位 20 種との境目を示す。

(B) *in vitro* のキナーゼアッセイ後、SDS-PAGE で分離し膜にプロットしたタンパク質に対して、抗リン酸化チロシン抗体を用いたチロシン残基リン酸化基質 (上図) 検出と、蛍光ラベルされたストレプトアビジンを用いたビオチン化転写因子 (下図) の検出を行っている。その結果、TF02 と TF14 の 2 種類のタンパク質が、AtCKL4 のリン酸化基質 (チロシン残基をリン酸化) であることがわかる。

TF14)。このようにプロテインキナーゼと相互作用するタンパク質を見つけることができれば、その上位 20~30 種類くらいの中に基質タンパク質が見つかることが多い。逆

のケースとして、プロテオミクス解析で見いだされた目的タンパク質と相互作用するプロテインキナーゼをプロテインキナーゼタンパク質アレイの中から見いだし、上位

20~30種類のプロテインキナーゼの中から、責任キナーゼを見つけることも可能である。本例で示すとおり、シグナル伝達解析に必要なプロテインキナーゼの基質探索もしくは目的タンパク質をリン酸化する責任キナーゼ探索にはタンパク質アレイと AlphaScreen 技術を組み合わせた手法は有用であるといえる。

2) ユビキチン化ユビキチンリガーゼの探索の実際

我々はユビキチンリガーゼタンパク質アレイの最初の目的タンパク質として、四つのがん抑制タンパク質 (p53, PTEN, CLYD, LKB1) に着目した。p53 に代表されるがん抑制タンパク質は、細胞のがん化を抑制する最後の砦として機能している。がん細胞の中ではがん抑制タンパク質が変異している場合が多く、また、まったく正常なタンパク質をコードしていてもがん細胞内ではがん抑制タンパク質の発現が検出できない例も報告されている。我々は、細胞のがん化やがん細胞維持に積極的にユビキチンリガーゼが関与し、がん抑制タンパク質を分解する経路が存在するのではないかと考え研究を進めた。

我々が構築したユビキチンリガーゼタンパク質アレイではユビキチンリガーゼは N 末端にビオチン化されているので、がん抑制タンパク質は Flag ラベルした。それらを用いて 3 節で述べたタンパク質-タンパク質相互作用検出方法により、がん抑制タンパク質と相互作用するユビキチンリガーゼの同定を試みた。p53 の例を紹介するが、AlphaScreen により既報の MDM2 や MDM4 (MDMX) との相互作用が検出できている (図 4A)。我々はそれら以外にも、p53 と相互作用する新規ユビキチンリガーゼを複数見いだした。また、これまでに RING 型ユビキチンリガーゼとの報告例がない、PTEN, CYLD, LKB1 においても数種類の相互作用するユビキチンリガーゼが見つかった。次に 3 節で述べた方法でユビキチン化検出を試みた。モデル実験の結果を示すが、p53 と MDM2 を混合するとユビキチン化が検出された (図 4B)。次に *in vitro* でユビキチン化活性を示す新規ユビキチンリガーゼ (New E3) を細胞内で発現させ、プロテアソーム阻害剤の MG132 で処理後、内在の p53 を免疫沈降したところ、新規ユビキチンリガーゼ依存的な p53 のユビキチン化を検出した (図 4C)。他のがん抑制タンパク質に関しても、同様に新規ユビキチンリガーゼの同定に成功している。また、解析の途中であるが、p53 を分解する新規ユビキチンリガーゼのノックアウトマウスで、p53 発現の上昇が確認され、タンパク質アレイで見いだされたクローンが、細胞のみならず個体レベルでも機能していることが示唆された。以上のように、試みた四つのがん抑制タンパク質の全てにおいて細胞内で RING ドメイン依存的にユビキチン化するユビキチンリガーゼが同定されたことから、紹介したタンパク質アレイを基盤としたユビキチンリガーゼ同定法が有効であるとい

える。実際、2 種類の未精製のままの合成タンパク質溶液を、機械にセットして単に混合するだけで、ユビキチンリガーゼが見つかるというこの方法は、非常に簡便であると感している。

6. 今後の展望 (研究の方向性と期待)

我々の開発してきた無細胞タンパク質アレイの構築法、タンパク質-タンパク質間相互作用検出法、ユビキチン化検出法、およびその実施例を紹介してきた。これらの手法を用いれば、リン酸化やユビキチン化により惹起されるシグナル伝達に關与するタンパク質を網羅的に探索できるものと考えている。実際、多くの共同研究を通じて責任キナーゼや責任ユビキチンリガーゼが多数見いだされており、本アプローチの汎用性の高さを実感している。責任キナーゼや責任ユビキチンリガーゼをこのような方法で生化学的に同定する技術は、世界的に開発が遅れている状況にある。その大きな原因は、機能を保持したタンパク質アレイを整備できない点にある。我々は 10 年以上に渡り、先代の遠藤弥重太教授 (現: 愛媛大学栄誉特別教授) と共にコムギ無細胞タンパク質合成技術を開発し、タンパク質合成における諸問題をほぼ全て解決済みである。その発展が、タンパク質アレイを用いた技術開発につながったと考えている。シグナル伝達機構の中心として考えられているプロテインキナーゼの遺伝子数は、ヒトの場合で 500 種類程度である。プロテインキナーゼが惹起するシグナル伝達経路は、生命現象の隅々まで機能していることが明らかとなりつつある。600~800 種類のユビキチンリガーゼが存在していることを考えると、ユビキチン化が惹起するシグナル伝達機構は、細胞の制御機構として、どの程度広がりを見せるのか非常に楽しみである。さらに、プロテインキナーゼとユビキチンリガーゼによる協調的なシグナル伝達制御機構の可能性も示唆されており¹⁰⁾、この分野から目が離せない状況である。これらの研究に今回ご紹介した技術が少しでも役に立てばと願う。

タンパク質アレイと AlphaScreen 技術を組み合わせた方法論は、ここに紹介したプロテインキナーゼの基質探索やユビキチンリガーゼの同定のみならず、プロテアーゼ基質の探索^{2,7)}や、患者血清内の抗体と反応する自己抗原タンパク質の探索¹¹⁾など様々な応用技術として利用可能である。また最近では、これまで難しかった膜タンパク質の合成に關しても、コムギ無細胞系に人工膜 (リポソーム) を添加するだけで、膜タンパク質が効率よく合成できるようになった¹²⁾。しかも、この手法で合成した GPCR (G タンパク質共役受容体) などの難易度が高いとされる膜タンパク質も機能を有していることがわかってきている。現在、今回ご紹介した AlphaScreen 技術とビオチン化リポソームを組み合わせ、種々の膜タンパク質と相互作用するタンパク質を

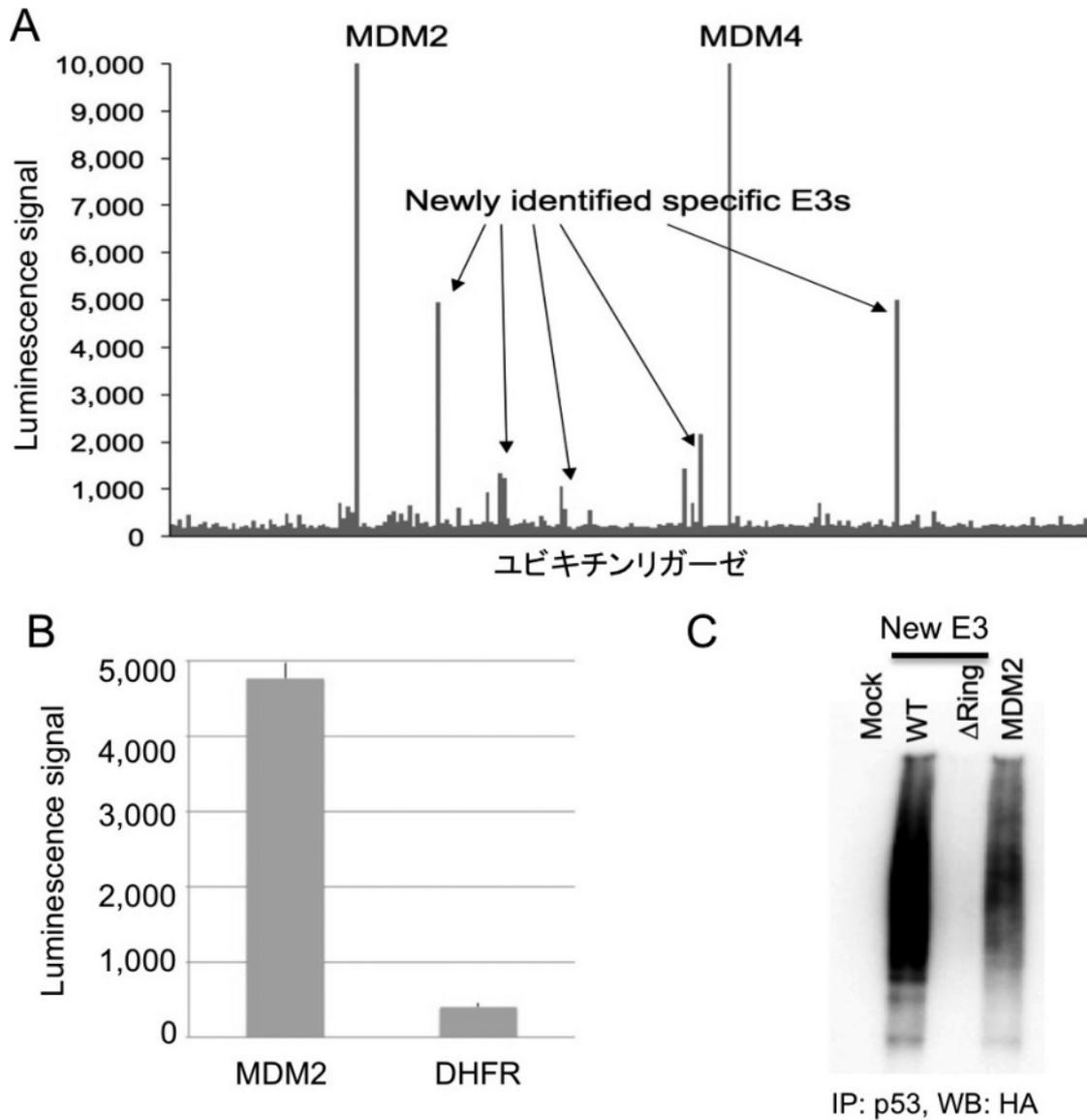


図4 がん抑制タンパク質を標的とするユビキチンリガーゼの探索例

(A) 230種類のビオチン化されたヒトユビキチンリガーゼタンパク質アレイとFlagラベルされたp53との相互作用をAlphaScreen法により測定した。縦軸は蛍光値、横軸は個々のユビキチンリガーゼを示している。既報のMDM2やMDM4との相互作用以外にも、数種類のp53と相互作用する新規なユビキチンリガーゼが検出された。

(B) AlphaScreen法を用いた、MDM2依存性のp53のユビキチン化検出の例。コントロールとして用いた大腸菌DHFRタンパク質を添加した反応液の発光値はバックグラウンドレベルであるが、MDM2と混合すると発光値が得られる。

(C) 野生型p53タンパク質を発現しているU2-OS細胞に、HAタグのユビキチン遺伝子と種々のユビキチンリガーゼ遺伝子を導入した。遺伝子導入20時間後にMG132で6時間処理した細胞を回収し、抗p53抗体で免疫沈降した。既報のMDM2と同様に、相互作用していたユビキチンリガーゼ(New E3)依存性のユビキチンが抗HA抗体により検出された。RINGを欠損した遺伝子の導入では、p53のユビキチン化は見られなかった(ΔRing)。

網羅的に同定可能な技術を開発中である。近い将来、細胞質のタンパク質相互作用探索技術のみならず、細胞膜上の相互作用を検出できる新しいシグナル伝達系の解析技術として紹介できる日が来ると確信している。この機会を利用して、ご紹介した方向論が皆さんの研究に利用できること

があれば非常に嬉しく思う。多くの共同研究を推進しているところでもあり、もし我々の系が利用可能であれば、ご連絡いただきたい。

謝辞

本稿は、新学術領域研究「修飾シグナル病」の支援による研究である。領域代表の東京大学医科学研究所の井上純一郎教授、および我々のユビキチン研究に関して全面的に助言・指導していただいている群馬大学の徳永文稔教授に、心から感謝したい。

文 献

- 1) Sawasaki, T., Gouda, M.D., Kawasaki, T., Tsuboi, T., Tozawa, Y., Takai, K., & Endo, Y. (2005) *Methods Mol. Biol.*, **310**, 131–144.
- 2) Tadokoro, D., Takahama, S., Shimizu, K., Hayashi, S., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2010) *Cell Death Dis.*, **1**, e89.
- 3) Nemoto, K., Seto, T., Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2011) *Phytochemistry*, **72**, 1136–1144.
- 4) Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 399–434.
- 5) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14652–14657.
- 6) Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2009) *BMC Plant Biol.*, **9**, 39.
- 7) Miyakawa, K., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Tokarev, A., Quinn, G., Kimura, H., Nomaguchi, M., Adachi, A., Yamamoto, N., Guatelli, J., & Ryo, A. (2012) *Sci. Signal.*, **5**, ra73.
- 8) Akagi, T., Shimizu, K., Takahama, S., Iwasaki, T., Sakamaki, K., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 1835–1840.
- 9) Takahashi, H., Ozawa, A., Nemoto, K., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Takeda, H., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2012) *FEBS Lett.*, **586**, 3134–3141.
- 10) Lu, Z. & Hunter, T. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 435–475.
- 11) Matsuoka, K., Komori, H., Nose, M., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 4264–4273.
- 12) Nozawa, A., Ogasawara, T., Matsunaga, S., Iwasaki, T., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2011) *BMC Biotechnol.*, **11**, 35.